Retinoic Acid가 인체 호흡기 상피세포에서 점액과 비점액성 분비에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] National Institute of Environmental Health Sciences, NIH[2]
윤주헌[1] · 김성식[1] · 박인용[1] · Paul Nettesheim[2]

Regulation of Mucin and Non-Mucin Secretions and Gene Expression by Retinoic Acid in Human Airway Epithelium

Joo-Heon Yoon, MD[1], Sung-Shik Kim, MD[1], In Yong Park, MD[1] and Paul Nettesheim, MD[2]
[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea,
[2]Laboratory of Pulmonary Pathobiology, National Institute of Environmental Health Sciences, NC, USA

ABSTRACT

Background and Objectives: Airway hypersecretion is a frequent feature of several respiratory tract diseases including rhinitis, sinusitis, and otitis media. Efforts are being made in several laboratories to elucidate mechanisms involved in the regulation of secretion. There are several factors which modulate expression of the secretory phenotype, such as retinoic acid (RA), triiodothyronine, steroid, and extracellular matrix. We have been interested in elucidating the role of retinoids in regulating differentiation of mucin and non-mucin secretions. **Materials and Methods**: Retinoic acid was removed from the culture media of normal human tracheobronchial epithelial cells grown in the air-liquid interface cultures. The effects on cell phenotype and mucin, lysozyme (LZ), and the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) secretion and gene expression were examined. **Results**: Removal of RA from the media induced squamous differentiation and caused a drastic decrease in mucin secretion and a decrease in expression of the mucin genes, MUC2 and MUC5AC. Lysozyme and SLPI secretions were increased in RA-depleted cultures. Paradoxically, LZ mRNA was decreased, while the SLPI mRNA levels were increased. A most intriguing finding was the paradoxical response of LZ to RA-depletion. The reason for this apparant incongruity between mRNA and protein levels is currently under investigation. **Conclusion**: Our studies show that RA is an important factor for mucous differentiation. **(Korean J Otolaryngol 1998;41(4):474-480)**

KEY WORDS: Mucin · Lysozyme · SLPI · Human airway epithelium.

서 론

호흡기에서 과분비는 각종 비염, 부비동염, 삼출성 중이염, 기관지염 등의 흔한 호흡기 질환에서 볼 수 있는 공통적인 현상으로 이런 과분비의 기전을 밝히기 위한 연구가 활발히 행하여지고 있다. 분비세포의 종류는 점액성과 장액성으로 나누어져 있는데 이는 형태학적 근거를 둔 것으로 점액성 세포는 점액을 분비하며 장액성 세포는 리소자임, 락토페린, 알부민 및 secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI) 등을 분비한다고 알려져 있다.[1)2)]

서로 다른 분비물들의 분비 조절기전은 아직 매우 불확실하며 매우 피상적인 지식만이 알려져 있다. 최근 보고는 사이토카인, 성장인자 및 세포외기질이 세포의 분비에도 역할을 할 수 있음을 암시하고 있다.[3)] 저자들은 인체 정상 기도상피세포에서 분비물의 구성에 영향을 주는 인자에 관심을 가져 왔다. 그중 retinoids는 생체에서 결핍시켰을 때 기도상피세포에서 편평화생을 유도한다고 알려져 있으며[4)] McDowell 등[5)]은 retinyl acetate로 비타민 A 결핍시킨 햄스터에 치료하였을 때 24시간 이내에 점액성 분비과립이 생기는 것을 보고하였고 Clark 및 Marchok[6)]은 쥐의 기도점막 배양에 비타민 A를 투여하였을 때 점액성 당단백질의 분비가 증가함을 보고하였는데 이러한 결과는 비타민 A 투여가 점액분비를 증가시킴을 암시하고 있다. 최근

논문접수일 : 1997년 8월 18일 / 심사완료일 : 1998년 1월 12일
교신저자 : 윤주헌, 120 - 140 서울 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8484 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

Table 1. Normal human tracheobronchial epithelial cell culture media

Components	Concentration	Supplier
BEGM : DMEM	1 : 1 mixture	Clonetics Corp., GIBCO
Insulin	5.0 μg/ml	Clonetics Corp.
Hydrocortisone	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Epinephrine	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Triiodothyronine	6.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Transferrin	10 ng/ml	Clonetics Corp.
Epidermal growth factor	0.5 ng/ml	Collaborative Res.
All-trans retionic acid	50 Nm	Sigma
Bovine pituitary extract	1% v/v	Pel Freez
Gentamycin : Amphotericin	50 μg/ml : 50 ng/ml	Clonetics Corp.
Bovine serum albumen	1.5 μg/ml	Sigma

*BEGM : Bronchial epithelial cell growth medium DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

점액유전자의 cDNA 구조가 밝혀지면서 현재는 9개의 점액유전자가 보고되어 있고 그중 MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC8의 7개가 기도에서 발현되는 것으로 알려져 있다.

이에 저자들은 retinoids에 속하는 retinol(Rol)과 retinoic acid(RA)중 어떤 것이 점액분비에 더 효과적인지를 알고자 하였고 더 효과적인 것을 선택하여 이것이 점액유전자(MUC2 및 MUC5AC)와 점액분비에 마치는 영향과 비점액성 분비물인 리소자임과 secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI)의 분비와 mRNA 발현에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

Air - liquid interface(ALI) 배양

10^5개의 인체 정상 기도상피세포(normal human tracheobronchial epithelial cells, passage - 2, strain 2002, Clonetics Corp., San Diego, CA)를, 반투과성막(Transclear, Costar Corp., Cambridge, MA)에 3.0 mg/ml의 제1형 콜라젠젤(Collaborative Res., New Bedford, MA)을 입혀 ammonium hydroxide가 들어 있는 밀폐된 곳에서 굳힌 후 serum - free, 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 배양액(Table 1)에 부유하여 평판하였다.[7] 세포들은 첫 7일간은 submerged 상태로 두며 배양액은 ALI(Fig. 1)를 만드는 7일까지 위 및 아래쪽 부분을 모두 격일로 갈아주었다. 그후는 배양액은 아래쪽 부분만 매일 교환해 주며 위쪽은 배양액을 제거하여 공기에 노출시켰다. 배양은 37℃, 5% CO_2에서 진행하였다.

조직학

인체 정상 기도상피세포를 14일간 배양한 후 10% 중성포르말린(neutral buffered formalin)에 고정하여, 2% agarose gel에 삽입하였으며 파라핀에 포매한 후 절단하였다. 절단된 조직들은 H&E 염색하였다.

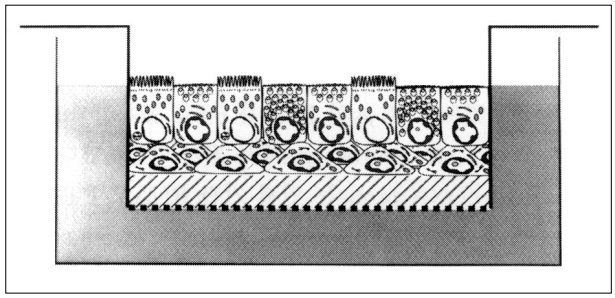

Fig. 1. Air-liquid interface culture.

점액, 리소자임 및 SLPI 분비의 면역적 검출 및 정량

배양된 인체 정상 기도상피세포에서 분비물 측정을 위한 방법은 immunoblot assay를 이용하는 Gray 등[7]이 기술한 방법을 사용하였다. 분비물은 배양세포들이 24시간동안 분비한 양을 수집하여 정량하였다. 점액과 리소자임은 immunoblot으로 측정하였고 SLPI는 ELISA(Quantikine™ Human SLPI Immunoassay, R & D systems, Minneapolis, MN)로 측정하였다. 순수 인체점액(a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)과 리소자임(Sigma, St. Louis, MO)을 표준으로 사용하였다. 일차항체로는 점액은 단클론성 항체인 17Q2(a generous gift from Dr. Judith St. George, Genzyme Corp., Framingham, MA)를 리소자임은 다클론성 리소자임 항체(Dako, Capintera, CA)를 사용하였다. 배양된 세포에서 채취된 분비물과 표준들은 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막 혹은 ELISA판에 적용하여 일차항체와 반응시킨후 horse - radish peroxidase conjugated goat anti - mouse IgG 혹은 anti - rabbit IgG에 반응시켰으며

chemiluminescence(ECL kit, Amersham, Buckingamshire, UK)로 발색시켰다. Standard curve를 linear regression analysis를 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색정도와 비교하여 그 양을 정량하였다. 리소자임 항체의 특이성은 western blot에 의해 확인하였다. 각 그룹에서 배양된 세포들의 수는 세포들을 트립신처리하여 분리한 후 hemocytometer에 의해 측정하였다. 각 실험결과는 같은 실험을 3번이상 시행하여 평균±표준편차로서 나타냈으며 통계학적 처리는 Student's t-test로 하였다.

점액, 리소자임 및 SLPI mRNA의 발현

SLPI mRNA의 발현을 위한 northern blot

Total DNA를 배양 14일째 세포들에서 Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 이용하여 분리하였으며 10 μg의 RNA를 6.6% 포름알레하이드를 함유하는 1.5% agarose gel에서 전기 영동하였다. 223 bp의 SLPI cDNA probe는 인체 기관 RNA로 RT-PCR을 이용하여 만들었다. Sense 및 anti-sense oligonucleotide probes는 인체 SLPI의 이미 발표된 유전자 배열[8](Genbank accession # X04490, 5′ primer : TGCTTGCCCTGG-GAACTC ; 3′ primer : GGCTTCCTCCTTGTTGGG)에 근거하여 만들었다. cDNA PCR fragment는 TA Cloning Kit(Invitrogen, San Diego, CA)를 이용하여 pCR^{TM}II-vector에 넣었다. Probe를 만들기 위해 cDNA insert는 EcoRI으로 제한효소처리하여 추출하였으며 random prime reaction으로 ^{32}P로 방사성표지하였다. Northern blots는 68℃에서 하이브리드형성시켰으며 55℃에서 30분간 0.1X SSC/0.1% SDS로 세척하였으며 같은 용액에서 실온에서 5분씩 2회 세척하였다. 28S rRNA는 각 그룹간의 RNA loading을 표준화된 것을 검색하기 위해 사용하였으며 ^{32}P end-labelled oligonucleotide probe(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)로 반응시켰다.

점액과 리소자임 mRNA 발현을 위한 reverse transcriptionpolymerase chain reaction

점액과 리소자임 mRNA levels이 Northern blot에 의해 신뢰성있게 잘 검출이 되지 않아 Guzman 등[9]이 보고한 RT-PCR을 사용하였다. Oligonucleotide primers는 사람 MUC2[10](Genbank accession # L21998, 5′primer : TGCCTGGCCCTGTCTTTG ; 3′ primer : CAGCT-CCAGCATGAGTGC), MUC5AC[11](Genbank accession # U06711, 5′ primer : TCCGGCTCATCTTCTTCC ; 3′ primer : ACTTGGGCACTGGTGCTG), 사람 리소자임[12](Genbank accession #J0380q, 5′ primer : CTC-TCATTGTTCTGGGGC, 3′ primer : ACGGACAAC-CCTCTTTGC)에 대한 이미 발표된 염기배열을 이용해 MU-C2는 440 bp, MUC5AC는 680 bp, 리소자임은 350 bp로 디자인하였다. RT-PCR의 control gene으로서 β2 microglobulin(β2M) oligonucleotide amplimers는 335 bp를 만드는데 Clontech Lab.으로부터 구입하였다. RT-PCR은 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler를 이용해 시행하였으며 간단히 방법을 소개하면 total RNA(1 μg/20 μl reaction volume)를 random hexanucleotide primers와 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 이용해 cDNA로 reverse transcribe시켰다. 점액과 리소자임을 위해서는 RT reaction의 40%, β2M에는 4%를 사용해 각 0.2 mM의 primers를 이용해 증폭시켰다. PCR에서 $MgCl_2$의 적당한 농도를 optimization후 denaturation은 95℃에서 1분간, annealing temperature는 리소자임은 55℃, MUC2, MUC5AC 및 β2M은 60℃에서 1분간, extension은 72℃에서 1분간 시행하였다.

저자들은 상기 기술된 각 배양조건에서 각 유전자의 mRNA levels를 비교하기 위해 comparative kinetic analysis를 시행하였다. PCR products는 50 ng/ml ethidium bromide를 함유하는 2% Seakem agarose gel(FMC, Rockland, ME)에서 전기영동으로 분리하여 polaroid type 55 필림으로 사진을 찍었다. Negative films을 Molecular Dynamics Densitometer(Sunnyvale, CA)로 scan하여 그 signal을 ImageQuant software를 이용하여 분석하였다. PCR의 linear range는 PCR cycle 수당 발현강도를 정량하여 정하였다. 최종 산물이 mRNA로부터 생기고 genomic DNA 오염이 없었다는 것을 증명하기 위해 RT reaction에서 reverse transcriptase를 생략하므로써 음성대조군으로 삼았으며 RT-PCR의 특이성은 PCR fragment의 sequencing (dsDNA Cycle Sequencing System, GIBCO BRL)에 의해 확인하였다.

결 과

Retinoic acid와 retinol의 용량변화가 점액분비에 미치는 영향

RA와 Rol은 기도 상피세포의 배양에 가장 많이 사용되는 것으로 이 두가지 대표적인 retinoids가 점액분비에 미치는 효과를 비교하고자 하였다. 어떤 것을 사용하더라도

배양 14일째는 plateau phase에 도달하는 것을 관찰하였고 결핍상태에서도 아주 적은 양의 점액을 분비하는 것이 관찰되었다. 최대의 점액분비를 얻기 위해서는 RA는 5 nM, retinol은 50 nM이 필요하였으며 RA를 사용할 경우 Rol보다 10배 정도 적은 양으로도 같은 효과를 볼 수 있어 이후부터는 모든 실험에서 RA를 사용하였다(Fig. 2).

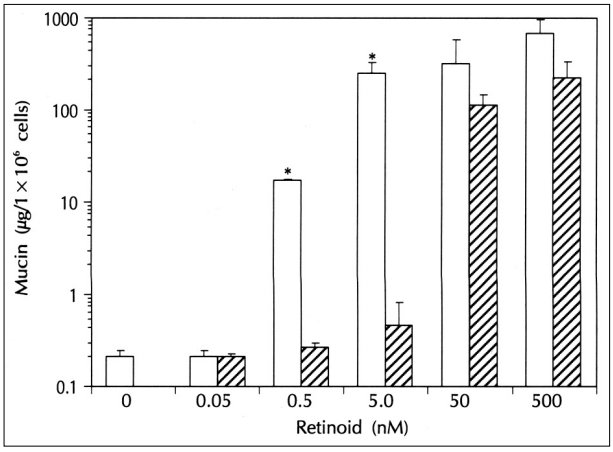

Fig. 2. Retinoic acid and Retinol dose effects on mucin secretion. NHTBE cells were grown in culture media containing different concentrations of either retinoic acid (solid bars) or retinol (diagonal lines). Apical secretions from plateau cultures were collected on day 14 and mucin production was determined by immunoblot.

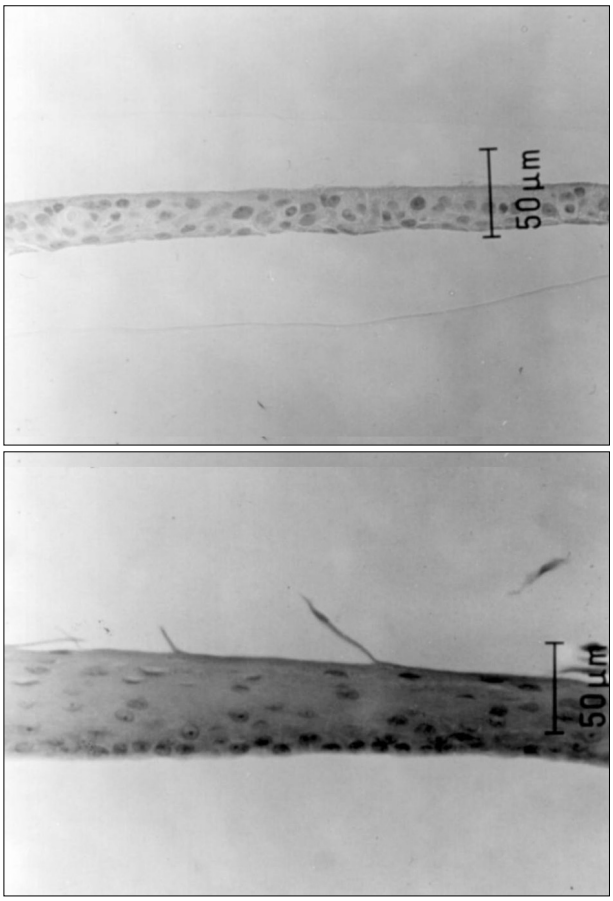

Fig. 3. Histology in the presence (upper) or absence (low) of retinoic acid. Depletion of RA from the media induced squamous differentiation.

RA결핍을 유도하였을 때의 형태학적 변화

RA결핍을 유도하면 배양14일 째 기도 상피세포에서는 편평화생이 일어남이 관찰되었으며 RA가 보충된 표준배양액을 사용할 때는 점액섬모상피가 관찰되었다(Fig. 3).

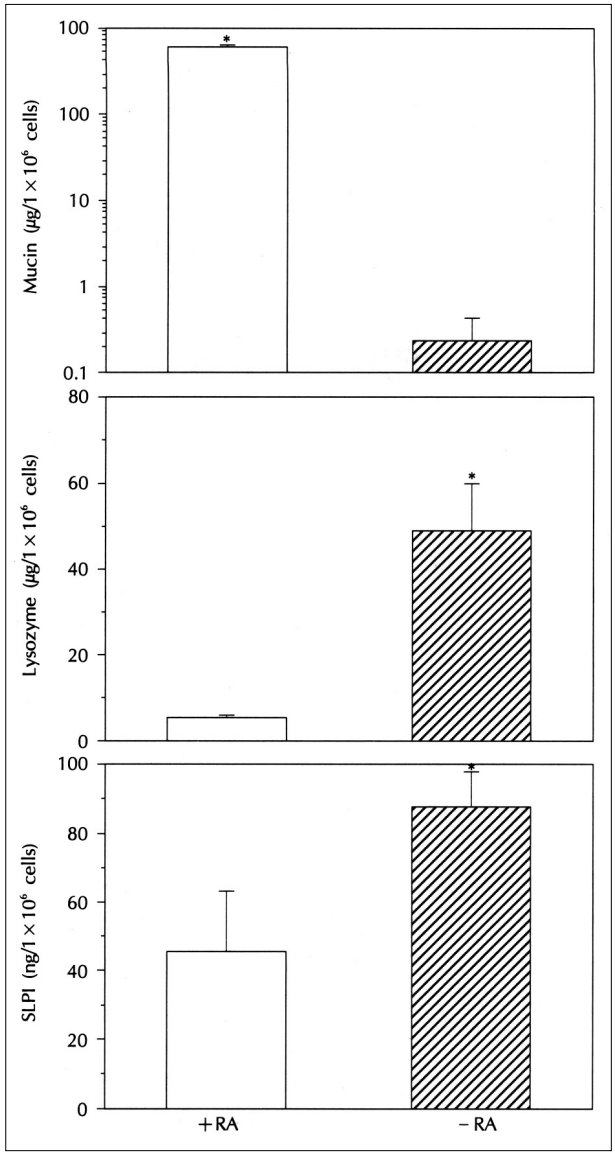

Fig. 4. Effect of retinoic acid on the expression of different secretory products. NHTBE cells were grown in either the presence (solid bars) or absence (diagonal lines) of retinoic acid and the levels of mucin, lysozyme, and secretory leukocyte protease inhibitor present in the apical secretions were determined. Asterisk indicates statistically significant differences between the 2 groups ($p<0.01$ for mucin and lysozyme and <0.05 for secretory leukocyte protease inhibitor).

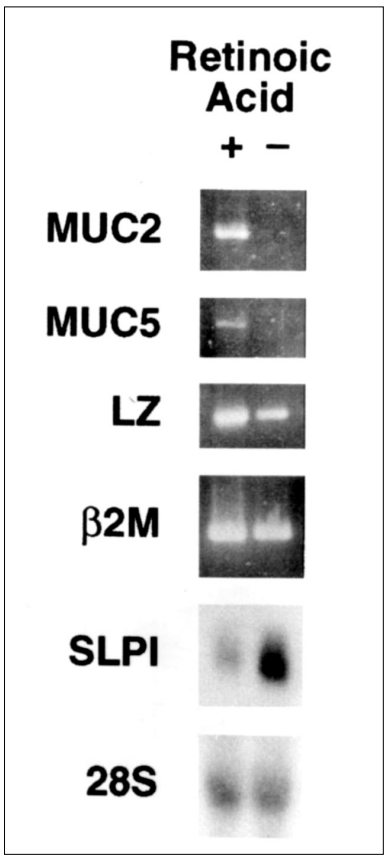

Fig. 5. Retinoic acid regulation of secretory gene mRNA levels in NHTBE cells. RNA was collected from day 14 cultures described in Fig. 4. The expression of MUC2, MUC5AC, lysozyme (LZ), and the control gene b2M were determined by RT-PCR. The expression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and loading control 28S rRNA were determined by Northern blotting.

점액, 리소자임 및 SLPI 단백질 분비에 대한 RA의 효과

배양액에서 RA를 제거한 상태에서 기도 상피세포를 배양하여 14일째 세포외로 분비된 점액, 리소자임 및 SLPI 단백질을 채취하여 그 양을 정량하였다. RA를 없애면 점액 분비는 현저히 줄어드는 것이 관찰되었고 반대로 리소자임은 10배정도, SLPI는 2배정도 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

점액, 리소자임 및 SLPI mRNA에 대한 RA 의 효과

MUC2와 MUC5AC는 RA가 들어 있는 상태에서는 잘 발현이 되었으나 RA 결핍된 상태에서는 발현이 되지 않았다. 리소자임 mRNA는 RA가 들어 있는 상태에서 강하게 발현이 되었으나 RA 결핍상태에서는 리소자임 mRNA의 양이 오히려 감소된 것이 동일하게 지속적으로 관찰되었다. SLPI mRNA는 Northern blot을 사용하였으며 RA를 결핍시키면 증가하였다(Fig. 5). 한편, RT - PCR의 control gene으로 사용한 β2M과 Northern blot의 control gene으로 사용한 28S rRNA는 RA에 의해 영향을 받지 않았다.

고 찰

인체 기도 점막에 존재하는 분비세포는 표면상피세포에 있는 점액성 배세포, 점막하 선조직에 있는 장액성과 점액성 분비세포가 있지만 크게 점액을 분비하는 점액성 분비세포와 비점액성 분비물을 분비하는 장액선 분비세포로 나눌 수 있다. 성인 인체의 기도 표면상피세포에 존재하는 유일한 분비세포는 배세포이며 점막하에서는 점액성 분비세포와 장액성분비세포가 동시에 존재한다. 병원체가 없는 환경에서 자란 설치류는 기도 표면상피세포에서 발견되는 대부분의 분비세포가 장액성 분비세포라고 보고되어 있으나[1)2)] 어떤 자극물질에 노출된 경우, 감염 및 세균성 lipo - polysaccharide 등은 장액성 분비세포를 점액성 분비세포로 변화시킬 수 있다고 보고되어 있다.[13)14)] 여러 학자들은 배양된 기도 상피세포들은 점액유전자뿐만 아니라 비점액성 분비물들의 유전자들도 발현하며 점액과 장액성 분비세포에서 분비되는 리소자임, 락토페린, SLPI 등을 분비한다고 보고하고 있다.[15 - 17)]

RA가 배양액내에 있을 때는 상피세포가 점액섬모상피로 분화가 되었지만 RA를 결핍시켰을 때는 편평상피세포로 변하는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 in vivo와 in vitro 연구들 모두에서 RA 결핍이 일어나면 상피세포의 편평화생이 일어나므로써, 기도에서 흔히 볼 수 있는 편평화생이 염증이나 어떤 자극에 의해 이차적으로 국소 부위에 RA 부족으로 인하여 편평화생이 일어날 가능성이 있으나 이를 확인하기 위해서는 인체 부위마다 국소부위의 비타민 A 농도를 알아보는 것이 필요하다 하겠다.

점액유전자 정량은 Northern blot을 사용하였을 경우 점액의 polydispersity 때문에 smear가 나타나 양의 비교가 어려워 ribonuclease protection assay(RPA)나 정량적 RT - PCR을 사용하여야 하는데 저자들은 Guzman 등[9)]이 최근 보고한 점액유전자의 정량을 위한 RT - PCR방법을 사용하였다. RA는 정상 기도상피세포에서 점액분비를 증가시키므로써 상피세포의 점액섬모상피세포로의 분화에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었고 이는 Christensen 등[18)]의 보고와 일치하였다. 한편, 점액유전자인 MUC2와 MUC5AC mRNA는 RA결핍시는 발현이 되지 않았으며 RA가 들어 있는 배양액에서는 모두 잘 발현이 되는 것이 관찰되어 RA가 점액유전자를 증가시켜 점액분비를 증가시키는 것으로 사료되나, 정상 기도상피세포에서 점액의 분비증가가 MUC2

와 MUC5AC mRNA 모두 증가에 의한 것인지 어느 한 점액유전자에 의한 것인지 알 수 없고 또한 이번 실험에서 검증하지 않거나 아직 밝혀지지 않은 또다른 점액유전자에 의한 것일 수 있을 가능성을 배제할 수 없다.

리소자임은 1922년 Fleming이 처음 발견하여 단백질로서는 처음으로 그 구조가 밝혀진 물질이며 세균막에 존재하는 peptidoglycan을 파괴함으로써 항균작용을 나타내는 14,000 D 크기의 단백질로 유전자는 5856 bp로 비교적 작은 편이다.[19] 리소자임은 최근들어 그람음성균에서 분비하는 lipopolysaccharide의 lipid - A에 직접 반응하여 독성을 줄일 수 있다고 보고되어 있다.[20] 따라서 섬유성 낭종 환자나 후천성면역결핍 등의 면역이 떨어져 있는 환자에서 대부분 사망의 원인은 pseudomonas 감염에 의한 septic shock인데 이런 환자에서 리소자임의 분비를 늘려 사망률이나 이환율을 감소시키려는 노력이 진행되고 있다. 이번 연구에서 RA 결핍시 단백질 분비는 10배정도 증가하였으나 mRNA는 오히려 감소하였고 RA가 배양액에 들어 있을 경우에는 리소자임 단백질 분비는 감소하였으나 mRNA는 증가하므로써 리소자임 mRNA와 단백질의 양에 상당한 불일치가 있었으며 6회 이상의 반복된 실험에서 지속적으로 동일한 결과를 얻으므로써 실험 잘못으로 인한 것이 아님을 확인할 수 있었다. 이러한 불일치의 원인은 현재로서는 확실하지 않으나 RA 결핍된 세포에서 배양 14일째 세포내 리소자임의 양이 매우 높아, 세포내에 만들어진 단백질이 mRNA의 형성을 억제하는 negative feedback mechanism이 있을 가능성이 있으며 혹은 post - transcriptional regulation될 가능성이 있다. 그러나 이번 연구 결과는 배양 14일째, 한 시점에서만 검사를 한 것이기 때문에 배양 시기에 따른 리소자임 단백질과 mRNA의 변화를 검사할 필요성이 있고 post - translation regulation될 가능성을 검사하기 위해 단백질의 생성속도와 분해속도를 검사할 필요가 있다고 생각된다.

SLPI는 12 kD 크기의 non - glycosylated serine anti - protease로 다양한 단백질 분해효소를 파괴시킬 수 있는데 그중에서도 neutrophil elastase와 cathepsin G의 작용을 막는 것이 주요 기능으로 알려져 있으며 호흡기 상피세포에서도 국소적으로 만드는 것으로 보고되어 있다.[8] SLPI는 mucus protease inhibitor(MPI), antileukoprotease (ALP) 혹은 bronchial inhibitor(BrI)로 불려지기도 한다. RA 존재 유무와 무관하게 정상 기도상피세포에서 발현이 됨으로써 기도 상피세포가 직접 만들 수 있음을 알 수 있었고 RA결핍시 SLPI 분비는 통계학적으로 의의있게 평균 1.8배 증가하였고, mRNA와 단백질이 동시에 증가함이 관찰되었는데 이는 transcriptional regulation됨을 의미한다고 하겠다.

결론적으로 RA는 점액성 분화에 매우 중요한 인자의 하나이며, 점액섬모상피세포에서는 점액이 많이 분비되며 편평화생시에는 비점액성 분비물들이 많이 분비되는 것을 알 수 있었다. 그러나 지금까지 모든 결과에서 나타난 변화는 점액섬모상피가 편평화생으로의 형태학적 변화가 함께 일어나기 때문에 이러한 변화가 정상 기도 상피세포의 형태학적 변화에 의한 이차적인 것인지 혹은 RA에 특이적으로 반응하는 것인지에 대한 연구가 향후 필요할 것으로 사료된다. 최근 기도 상피세포에서 7개의 점액유전자가 발견되는 등 점액 분야에 많은 연구가 진행되고 있지만 MUC1과 MUC2만이 전체 염기배열이 밝혀져 있으며 MUC5AC는 금년 12월 정도면 전체 염기배열이 밝혀질 전망이다. 지금까지 어떤 점액유전자가 정상상태에서 발현되고, 또한 부비동염과 같은 병적인 상태에서 어떤 점액유전자에 의해 점액분비가 증가되는지를 모르는 초보적인 단계에 있다 할 수 있어 이를 해결하기 위해서 각 점액유전자에 특이적인 항체를 만드는 것이 여러 가지 어려움이 있지만 향후 점액 연구의 중요한 분야일 것으로 생각된다.

중심 단어 : Retinoic acid · 점액 · 비점액성 분비.

REFERENCES

1) Basbaum CB, Finkbeiner WE. *Mucus producing cells of the airways. In Lung Cell Biology. D. Massaro, editor. Marcel Dekker. New York;1989. p.7-79.*
2) Basbaum CB, Jany B, Finkbeiner WE. *The serous cell. Annu Rev Physiol 1990;52:97-113.*
3) St. George J, Read L, Crauz D, Tarantal A, George-Nascimento G, Plopper C. *Effect of epidermal growth factor on the fetal development of tracheobronchial secretory apparatus in rhesus monkeys. Am J Respir Cell Mol Biol 1991;4:95-101.*
4) Newton DL, Henderson WR, Sporn MB. *Structure-activity relationships of retinoids in hamster tracheal organ culture. Cancer Res 1980;40:3413-25.*
5) McDowell EM, Keenan KP, Huang M. *Restoration of mucociliary tracheal epithelium following deprivation of vitamin A. Virchows Arch 1984;45:221-40.*
6) Clark JN, Marchok AC. *The effect of vitamin A on cellular differentiation and mucous glycoprotein synthesis in long-term rat tracheal organ cultures. Differentiation 1979;14:175-83.*
7) Gray T, Guzman K, Davis CW, Abdullah L, Nettesheim P. *Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:104-12.*
8) Heinzel R, Appelhands H, Gassen G, Seemuller U, Machleidt W, Fritz H, Steffens G. *Molecular cloning and expression of cDNA for muman antileukoprotease from cervix uterus. Eur J Biochem 1986;160:61-7.*
9) Guzman K, Gray T, Yoon J-H, Nettesheim P. *Quantitation of mucin RNA by PCR reveals induction of MUC2 and MUC5 mRNA levels by retinoids. Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 15) 1996;*

271:L1023-8.

10) Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. *Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. J Biol Chem 1994;269:2440-6.*
11) Meerzaman D, Daskal C, Polymeropoulos M, Martin B, Rose M. *Cloning and analysis of cDNA encoding a major airway glycoprotein, human tracheobronchial mucin (MUC5). J Biol Chem 1994;269:12932-9.*
12) Chung LP, Keshav S, Gordon S. *Cloning the human lysozyme cDNA inverted Alu repeat in the mRNA and in situ hybridization for macrophages and Paneth cells. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:6227-31.*
13) Jany B, Gallup M, Tsuda T, and Basbaum C. *Mucin gene expression in rat airways following infection and irritation. Biochem. Biophys Res Comm 1991;181:1-8.*
14) Steiger D, Hotchkiss J, Bajaj L, Harkema J, and Basbaum C. *Concurrent increases in the storage and release of mucin-like molecules by rat airway epithelial cells in response to bacterial endotoxin. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12:307-14.*
15) Abbinante-Nissen JM, Simpson LG, Leikauf GD. *Neutrophil elastase increases secretory inhitibor transcript levels in airway epithelial cells. Am J Physiol 1993;265:L286-92.*
16) Finkbeiner WE, Carrier SD, Teresis CE. *Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) phenotypic analysis of cell cultures of human tracheal epithelium, tracheobronchial glands, and lung carcinomas. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;9:547-56.*
17) Zile MH, Cullum ME. *The function of vitamin A. Current concepts. Proc Soc Exp Biol Med 1983;172:139-52.*
18) Christensen TG, Breuer R, Haddad CE, Niles RM. *Quantitative ultrastructural analysis of the relationship between cell growth, shape change, and mucosecretory differentiaton in cultured hamster tracheal epithelial cells exposed to retinoic acid. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;9:287-94.*
19) Short ML, Nickel J, Schmitz A, Renkawitz R. *Lysozyme gene expression and regulation. EXS 1996;75:243-57.*
20) Takada K, Ohno N, Yadomae T. *Lysozyme regulates LPS-induced interleukin-6 release in mice. Circulatory Shock 1994;44:169-74.*